

尿素分解・嫌氣的アンモニア酸化反応共役で拓く「高速」「高強度」微生物学的地盤固化

Development of "high-speed" and "high-strength" microbial ground improvement method with urea hydrolysis and anaerobic ammonia oxidation reaction coupling.

呉工業高等専門学校環境都市工学分野 助教 木村 善一郎

(研究計画ないし研究手法の概略)

1. はじめに

土砂災害をはじめとする自然災害の防止（防災）はわが国の土木工学分野にとって避けがたい重要課題である。本研究においては、土砂災害の防止を目指し、尿素の生分解過程で生じる炭酸カルシウムをグラウト（固化剤）として利用¹⁾する環境調和型軟弱地盤固化法の研究開発を行った。

グラウト注入工法は地盤改良技術としてすでに確立されているが、利用される化学的固化剤（セメントミルク等）は一般に固化後も強いアルカリ性を示すことから、田畑や住宅地など環境保全の要請が高い場所では使用が制限される。バイオグラウト制限を解消できる環境調和型技術として注目されている。最も研究例の多い尿素法においては微生物の尿素代謝により発生する炭酸イオンと土壌中に存在するカルシウムイオンとの結合により生成される炭酸カルシウムを最終的なグラウト成分としている。当該工法の研究事例は、そのほぼ全てが実験室レベルの小型供試体に対する微生物添加効果を検証したものであり、固化処理（i. e. 尿素分解に伴う炭酸カルシウム生成）は好気条件で進められている²⁾。しかしながら施工原位置となる軟弱地盤は嫌気環境であり、後述する理由から尿素分解による炭酸カルシウム生成に対し、酸素濃度および反応副産物であるアンモニア濃度は極めて重要な影響因子となる。

尿素的加水分解によるアンモニア・炭酸生産の自由エネルギー変化は以下の反応式で表される。



この式は、尿素分解が標準状態では進行しづらく、副生成物であるアンモニアの蓄積が反応を阻害することを意味する。バイオグラウトによる地盤固化の反応場は一般に地盤中であり、地盤は50cm程度の深度を境に嫌気（無酸素）環境である。このような環境においてアンモニア除去は容易には進まず、拡散によるアンモニア濃度低下が尿素分解および炭酸カルシウム形成の律速因子となるとことが予想される。従ってアンモニア除去律速の解消により、嫌気環境における地盤固化が劇的に促進されることが予想された。

嫌気環境におけるアンモニア除去に関わる代謝反応はAnaerobic Ammonia Oxidation (アナモックス) 反応と呼ばれ³⁾、嫌気環境下において尿素分解細菌とアナモックス細菌による共役反応系を構築することで尿素分解-アンモニア除去による炭酸カルシウムの生成が促進されると予想された。従って本研究においては、上記仮説に基づき尿素分解・アナモックス反応共役を用いた原位置土壌中で適用可能な軟弱地盤固化法の確立に取り組んだ。

2. 実験方法

2.1 リアクター構築と運転条件

嫌気環境における尿素分解細菌の集積は、嫌気ガス置換装置を用いて溶存酸素を除去した培地を作成しリアクターに低流速で流すことで行った。ガラス製カラム型リアクターを使用し、カラム内

に呉高専内土壌を圧密し嫌気尿素分解系集積の植種源とした（カラム-1）。またカラム-1の後段には、事前にアナモックス細菌をスポンジに高密度に担持させたガラスカラムを作成し、生産されたアンモニアの除去を行うことで共役反応を促進した。作成したリアクターには、尿素分解細菌及びアナモックス細菌の集積に好適な無機栄養培地に尿素のみを炭素源として加えたものを使用した。培地は低速でガラスカラムに供給しながら3か月にわたり集積培養した。



図-1 ガラスカラムリアクター外観（左：カラム-1, 右：カラム-2）

2.2 アンモニア濃度測定

本研究の培地成分に含まれるリン酸塩が、本校が所有する陽イオン分離カラムによるアンモニア分離および定量を阻害することが判明したため、代替的にインドフェノール青比色法によるアンモニア濃度測定を実施した。

2.3 菌叢解析

培養開始時および90日経過時の真正細菌叢を比較し、嫌気尿素分解に関与する細菌種の特定に取り組んだ。比較解析手法としてMiseq（イルミナ社）を使用し、集積培養物から得られた粗抽出DNAを16S rRNA V3-V4領域を標的する真正細菌ユニバーサルプライマー⁴⁾を用いて増幅し、得られたPCRアンプリコンを同装置により網羅的に解読することでリアクター陰極を構成する真正細菌叢を解明した。

（実験調査等により得られた新しい知見）

3. 実験結果

3.1 アンモニア濃度の経日変化

カラム-1とカラム-2からサンプリングした試水をインドフェノール青法により検量した結果は以下の図-2のようになった。

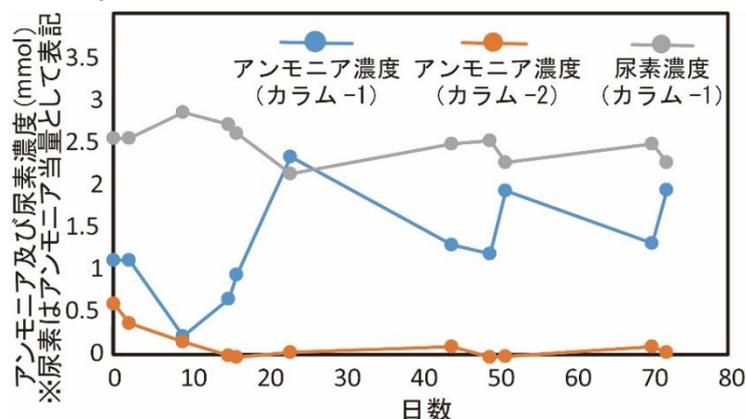


図-2 アンモニア及び尿素濃度の経日変化

3.3アンモニア測定の結果

カラム-1においてアンモニアが検出された。アナモックス細菌を担持したカラム-2ではアンモニアは確認できなかった。この結果からカラム-1に流入した尿素がカラム中の細菌により加水分解を受けアンモニアを生成し、更にカラム-2に流入することで除去を受けていることが示唆された。

3.4菌叢解析の結果

3.4.1土壌サンプルの菌叢解析

以下の図のように菌叢がカラム-1に形成された。培養90日経過後の*Amycolatopsis*属、*Streptosporangium*属、*Prostheco bacter*属の種には少なからず尿素を分解することができる種が確認されており^{4,5,6}菌叢の約24%を占めているため嫌気性状態において尿素分解を行っている可能性があることが判明した。実際の尿素分解活性の確認は当該系統に属する菌株の獲得が必要であるため今後の課題とする。

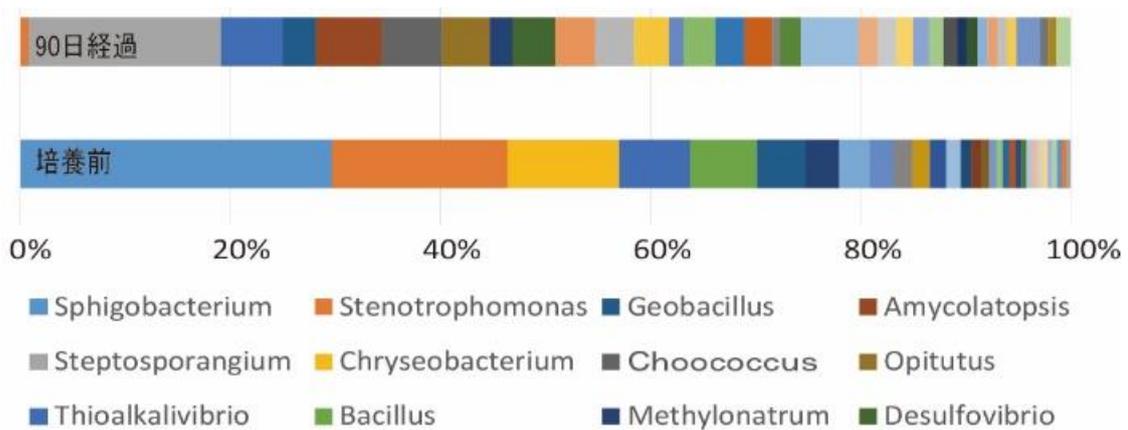


図-3-1 カラム-1内の真正細菌叢解析結果

3.4.2アナモックス細菌の担持カラムの菌叢解析

カラム-2からはアナモックス細菌を含むアンモニアを分解菌種は検出されなかった。しかし、前述したアンモニア測定の結果から、嫌気環境である当該条件においてアンモニアが除去されていることは確かであるため、集積度の不足や運転に伴うアナモックス細菌のウォッシュアウト等の要因で検出されなかった可能性がある。また、本リアクターは尿素を唯一のエネルギー源として与えており、アンモニアは尿素の分解に伴い供給されている。アナモックス細菌の基質となるアンモニアは尿素分解に対し従属的に供給されアナモックス細菌にとっての指摘条件とは言い難いため、これらの要因がアナモックス細菌が検出されなかった原因となった可能性がある。アナモックス細菌を高度集積可能な培養条件の探索が必要である。

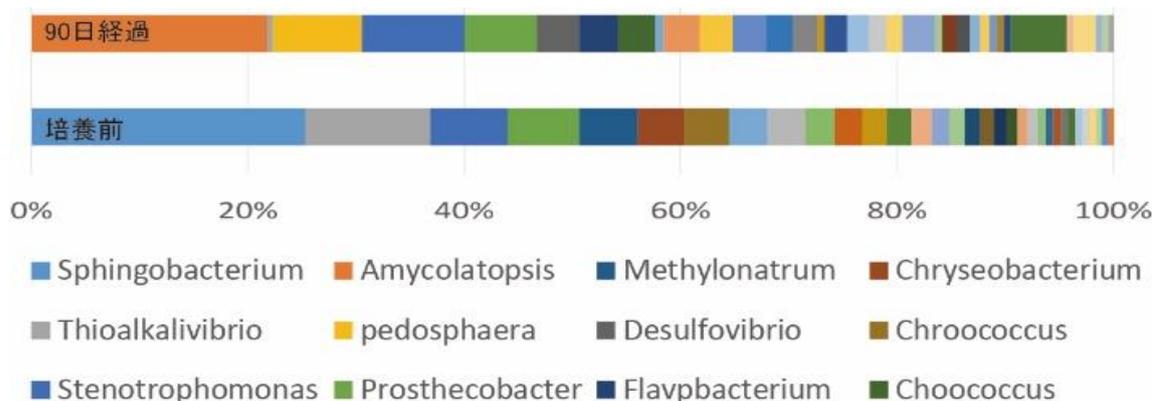


図-3-2 カラム-2内の真正細菌叢解析結果

4. 結論及び考察

4.1 結論

カラム-1において尿素分解活性を有する系統の細菌が全体の24%占めていることが判明した。また、尿素的生分解過程で発生するアンモニアの分解を行えるアナモックス細菌は菌叢解析では確認することができなかったがアンモニア測定の結果を見る限りアンモニアの除去が行われていることが分かった。その結果から、アナモックス細菌が少数ながらも存在している、すなわち反応共役が起きている可能性が示唆された。

4.2 今後の課題

今回の研究では嫌気性土壌で尿素は生分解されることと副産物であるアンモニアをアナモックス細菌が分解していることがわかった。しかし、アナモックス細菌の担持カラム（カラム-1）からはアンモニア分解に関与する微生物属が発見できなかったため集積期間を十分に取りアナモックス細菌の存在を明確にする必要がある。それと同時に液体培地に用いた組成を基に行う嫌気性ロールチューブにも成功したため今後の研究でアナモックス細菌の高度集積に取り組んでいく。

5. 参考文献

1. Whiffin VS, van Paassen LA, Harkes MP. *Geomicrobiology Journal*. 2007;24(5):417-23.
2. DeJong J, Soga K, Kavazanjian E, Burns S, Van Paassen L, Al Qabany A, et al. *Geotechnique*. 2013;63(4):287.
3. Jetten MS, Wagner M, Fuerst J, van Loosdrecht M, Kuenen G, Strous M. *Current opinion in biotechnology*. 2001;12(3):283-8.
4. Lee SD. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2006;56(3):549-53.
5. Ma Z, Liu H, Liu C, He H, Zhao J, Wang X, et al. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015;107(6):1491-9.
6. Lee J, Park B, Woo S-G, Lee J, Park J. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014;64(2):663-7.

(発表論文)

1. Akita, H., **Kimura, Z. I.**, & Matsushika, A. Complete genome sequence of *Ureibacillus thermosphaericus* A1, a thermophilic bacillus isolated from compost. *Genome announcements*, 5(38), e00910-17.(2017)2
2. **Kimura, Z.I.**, Kuriyama, H., Hoshino, T., & Murakami, K., Direct Cultivation of Electron Utilizing Bacteria using Solid-phase Electrochemical Colonization System, ISME 17th, Leipzig, Germany, Aug 11-17, 2018
3. Kuriyama, H., & **Kimura, Z.I.***, Development of Electron Utilizing Bacteria Specific “Directly” Isolation Device, International conference WET2017, Sapporo, Jul 22-23, 2017

上記に加え現在原著論文1件を執筆中。